

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580440

研究課題名(和文)アクチビンAによるマクロファージ活性化機構の解明と自然免疫に機能する化合物の探索

研究課題名(英文)Role of activin A in the innate immune responses -Identification of compounds that regulate innate immune responses-

研究代表者

小川 健司(Ogawa, Kenji)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：50251418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然免疫応答時にマクロファージが産生するActivin A のオートクラインループやオルタネーティブ活性化に対するActivin A の生理作用を分子レベルで解明するための研究を行った。TLR刺激を受けたマクロファージはActivin Aを産生し、分泌されたActivin Aはオートクラインループを介してArginase 1およびTGFB1発現を誘導していることが明らかになった。これらの因子は、Activin Aによるマクロファージのオルタネーティブ活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have studied the function of activin A produced by the activated macrophages during the innate immune responses. Murine peritoneal macrophages produced activin A in response to stimulation with R848, an agonist of TLR7. The activin A mRNA level was increased in macrophages by R848, suggesting that the activin production augmented by R848 is regulated at the mRNA level of the A gene. DNA microarray was employed to identify genes whose expression is regulated by autocrine activin A during innate immune responses. Peritoneal macrophages were cultured with R848 for 24 h in the presence or absence of anti-activin A neutralizing mAb. Total RNA was isolated from the cells and was subjected to microarray analysis. Arginase-1 and TGFB1 were found to be up-regulated by autocrine activin A in the activated macrophages. Findings indicated that these factors mediate activin A-induced alternative activation of macrophages during the innate immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：Activin A マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

「獲得免疫」は、外来の異物を抗原特異的に排除する生体防御機構であり、有顎脊椎動物にのみ認められる高度に洗練されたシステムである。一方、「自然免疫」は、殆ど全ての生物に備わっている非特異的な生体防御機構であり、病原体(異物)が侵入すると即座に応答する事が特徴である。近年、Toll様受容体(TLR)に代表されるパターン認識受容体が自然免疫応答において重要な役割を果たす事が明らかとなり、注目されている。TLRは、病原体(細菌、真菌、寄生虫、ウイルスなど)の構成成分に特徴的な構造を認識して結合し、転写因子やサイトカインの発現を誘導して感染初期の生体防御や獲得免疫の誘導に働く。

マクロファージは、自然免疫、獲得免疫の双方において重要な役割を果たす免疫担当細胞である。マクロファージのパターン認識受容体シグナル活性化による自然免疫応答の制御機構を分子レベルで理解する事は、ガンや感染症などの疾患を克服のみならず、アレルギー、自己免疫疾患などの異常な獲得免疫応答に起因する疾患を制御するためにも必要不可欠である。我々は、マクロファージの自然免疫応答(パターン認識受容体シグナル活性化)によるサイトカインの発現調節機構と、自然免疫および獲得免疫応答における役割に注目して研究を行って来た。

抗炎症性サイトカインとして知られるTGF- β 1は、副作用の無い抗炎症剤への応用が期待され、多くの研究が進められて来た。その一方で、同じTGF- β ファミリーに属するActivin Aの免疫担当細胞における発現や機能に関する研究は殆どなされていなかった。我々は、免疫担当細胞におけるActivin Aに着目して研究を進め、多くの興味深い知見を得ている。

(1) Activin AはTh2サイトカインである

我々は、CD4+T細胞が抗原刺激を受けて活性化すると、Activin Aを産生することを見出した。活性化したCD4+T細胞は、炎症などの細胞性免疫を担うタイプ1ヘルパーT細胞(Th1)またはアレルギーや抗体産生などの液性免疫に重要なタイプ2ヘルパーT細胞(Th2)のいずれかのエフェクター細胞へと分化するが、高レベルのActivin Aを産生するのはTh2であることが明らかとなった[1]。

(2) Activin Aはエフェクター細胞でのみ産生される

免疫応答を負に調節する制御性T細胞は活性化にともなってTGF- β を産生する。エフェクターであるTh2がActivin Aを産生するのに対して、サプレッサーである制御性T細胞は活性化してもActivin Aを産生しないことが示された。またTGF- β 1がT細胞の増殖を抑制するのに対し、Activin AはT細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。CD4+T細胞におけるActivin Aの発現と機能はTGF- β 1とは大きく異なり、両因子が免疫調節におい

て明確な機能分担をしていることが示された[1]。

(3) Activin Aはマクロファージのオルタネーティブ活性化を誘導する

近年、ヘルパーT細胞がTh1とTh2のいずれかに分化する様に、マクロファージも機能的に異なる二種類のタイプに分化する事が知られる様になった。Th1サイトカインの刺激を受けて「古典的活性化」したマクロファージはNOを産生し、細胞内寄生細菌やウイルス感染に対する防御に効果を示す。一方、マクロファージがTh2サイトカインの刺激を受けると、細胞外の病原体や寄生虫の除去に効果を発揮する「オルタネーティブ活性化」マクロファージへと分化する。他の代表的なTh2サイトカインと同様、Activin AはIFN- γ が誘導するNO₂の産生を抑制し、オルタネーティブ活性化マクロファージのマーカーであるarginase-1の発現を誘導する。一方、IFN- γ によって誘導される古典的活性化マクロファージのマーカーであるiNOSの発現を阻害する事から、Activin Aはマクロファージのオルタネーティブ活性化を誘導する事が明らかとなった[1]。

(4) Activin Aはマクロファージの活性化に伴って分泌される

更に、我々はマクロファージ自身がActivin Aを産生する可能性について検討した。その結果、マクロファージがTLR4の刺激(LPS)を受けて活性化すると、Activin Aを産生する事が明らかとなった[2]。一方、同じTGF- β ファミリーに属するTGF- β 1の発現は、マクロファージの活性化に伴って減少しており[3]、両者の自然免疫応答時における発現パターンは著しく異なる事が明らかとなった。

(5) Activin AとTGF- β 1はマクロファージでは異なる働きを示す

現在、TGF- β 1とActivin Aの細胞内シグナルは、同一の分子(Smad2/Smad3)によって伝達されると考えられている。実際に、汎用される細胞株において、二つの因子は類似の作用を示すことが多い。しかし、両者のアミノ酸配列の相同性は27%に過ぎない。両者の結合するII型受容体のアミノ酸相同性も32%に満たない。これ程異なる分子が何故同じ作用を持つ分子として進化して来たかに関する論理的な説明は、現在に至るも一切なされていない。我々は、Activin AとTGF- β 1が異なる作用を示す組織または細胞が体内のどこかに存在し、それが両因子の作用の本質を解明する「鍵」になるであろうと想定した。我々は、この仮説のもとに研究を進め、マクロファージでは、Activin AとTGF- β 1が異なる働きをする事を発見した。TGF- β 1はマクロファージのMMP-2およびMMP-9分泌を促進するが、Activin AはMMP-2のみの分泌を促進する[3]。マクロファージにおける両因子の発現パターンが著しく異なる事を考え併せると、この細胞を用いた研究に

よって、両因子のシグナリングの違いを解明しうる可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージにおける Activin A の発現調節機構と免疫調節作用に焦点を絞り、自然免疫における Activin A の役割を分子レベルで解明する事を目的とし、下記の研究を実施した。

1. TLR シグナルによる Activin A/TGF- β 1 発現調節機構
2. マクロファージの機能に対する内因性および外因性 Activin A/TGF- β 1 の作用の解析
3. マクロファージにおける Activin A のオートクラインループの解明

3. 研究の方法

1. TLR シグナルによる Activin A/TGF- β 1 発現調節機構の解明

3%Thioglycolate を腹腔内に投与した BALB/c マウスから、3 日後に腹腔内マクロファージを単離した。腹腔内マクロファージは TLR4、TLR7 および TLR9 のリガンド(それぞれ LPS、R848 および CpG オリゴヌクレオタイド)で刺激し、Activin A および TGF- β 1 の mRNA 発現、タンパク質産生、活性の分泌の経時的变化を、リアルタイム RT-PCR、ウェスタンブロットティング、ELISA、バイオアッセイを用いて詳細に検討した。また、シクロヘキシミドを添加した際にこれら因子の mRNA 発現レベルに生じる変化について検討し、転写および翻訳レベルでの発現調節機構を検討した。また、複数のマウスマクロファージ系細胞株 (Raw264.7 細胞、J774.1 細胞、PU5-18 細胞、M1 細胞など)を用いて同様の実験を行い、TLR シグナルによる Activin A/TGF- β 1 の発現を検討した。

2. マクロファージの機能に対する内因性および外因性 Activin A/TGF- β 1 の作用の解析

マウスマクロファージ初代培養系を用い、外因性の Activin A/TGF- β 1 やこれらの中和抗体を添加してその活性をブロックした際に、マクロファージの走化性 (Migration assay)、NO 産生 (Griess assay)、細胞障害活性 (Cytotoxic assay)、MHC 発現 (FACS)、サイトカインおよびケモカイン分泌 (ELISA)などの重要な機能に及ぼす影響を検討し、自然免疫応答時における Activin A/TGF- β 1 の機能について解析を行った。

3. マクロファージにおける Activin A のオートクラインループの解明

マウスから単離した初代培養マクロファージを抗 Activin A 中和抗体の存在下または非存在下において TLR リガンドで刺激し、24 時間後の RNA を Microarray 法で解析し、Activin A の中和によって発現量が減少する遺伝子を解析した。ここで得られた遺伝子の発現の変化をリアルタイム RT-PCR で経時

的に詳細に検討し、Activin A のオートクラインループを解析した。

4. 研究成果

我々はマクロファージが、その活性化にもなって Activin A を産生する事を明らかにして来た。本研究では、マクロファージが産生する Activin A の自然免疫および獲得免疫に果たす役割を明らかにする目的で、マクロファージにおける Activin A の発現とその機能を検討した。その結果、マクロファージが TLRs の刺激を受けて活性化すると Activin A を産生することが明らかとなった。この Activin A の産生は、mRNA レベルで調節されている事が示された。一方、TGF- β 1 の発現は TLRs 刺激によって抑制された。

次に、マウスから単離した初代培養マクロファージを抗 Activin A 中和抗体の存在下または非存在下において TLR リガンドで刺激し、24 時間後の RNA を Microarray 法で解析した結果、Activin A の中和抗体添加によって発現量が減少する数種類の遺伝子が得られた。更に、これらの遺伝子発現の経時的变化をリアルタイム RT-PCR などを用いて詳細に検討した。IFN- α 、IFN- β および TNF- α に代表される Early response genes のマクロファージにおける発現は、TLR 刺激後 30 分から 1 時間でピークを迎え、以後急激に減少する。Activin A、iNOS および T-bet などの Intermediate response genes は、TLR 刺激後 8 時間でピークを迎え、以後徐々に減少するが 24 時間後まで高い値が持続する傾向にある。Microarray によって得られた Activin A の中和によって発現量が減少する遺伝子の内、Arginase 1 および TGFB1 の二種類の発現は、TLR 刺激後 6 時間までは見られず、8 時間から 24 時間にかけて緩やかに上昇する Late response genes である事が明らかとなった。これらの遺伝子は、マクロファージを Activin A で刺激した際に、刺激後 8 時間をピークとして発現上昇が認められた。更に、これらの遺伝子の TLR 刺激後 24 時間での発現上昇は、Activin A 中和抗体によって大きく抑制されるが、類縁の因子である TGF- β 1 の中和抗体や isotype control では変化しなかった。これらの事から TLR 刺激を受けたマクロファージは Activin A を産生し、分泌された Activin A はオートクラインループを介してマクロファージの Arginase 1 および TGFB1 発現を誘導している事が明らかになった。

<引用文献>

1. Ogawa et al., 2006 J Immunol. 177: 6787-6794;
2. Ogawa et al., 2000 J Immunol 165: 2997-300
3. Ogawa et al., 2011 Mol Biol Rep 38: 1451-1456

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Izumi G, Koga K, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Ogawa K, Inoue S, Fujii T, Osuga Y. Cyclic Stretch Augments Production of Neutrophil Chemokines, Matrix Metalloproteinases, and Activin A in Human Endometrial Stromal Cells. *Am J Reprod Immunol.* 2015 73: 501-506, doi: 10.1111/aji.12359 査読有
2. Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M. (2014) TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 from Macrophages. *J Immunol.* 192: 4443-4452, doi: 10.4049/jimmunol.1300935 査読有
3. Murakami M, Shirai M, Ooishi R, Tsuburaya A, Asai K, Hashimoto O, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M (2013) Expression of activin receptor-like kinase 7 in adipose tissues. *Biochem Genet.* 51: 202-210, doi: 10.1007/s10528-012-9555-8 査読有
4. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Izumi G, Urata Y, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Koga K, Ogawa K, Kozuma S. (2013) Follistatin is induced by IL-1 β and TNF- α in stromal cells from endometrioma. *Reprod Sci.* 20: 675-679, doi: 10.1177/1933719112463253 査読有

[学会発表](計1件)

1. Ogawa K. Activin A in innate and acquired immunity. The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. October 2012 (Phuket, Thailand)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 健司 (OGAWA, Kenji)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：50251418